



AGR-05 AVALIAÇÃO MOLECULAR DE HIBRIDIZAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES À DOENÇA AZUL DO ALGODOEIRO

Cazé, A. L. R.^{1,2}; Hoffmann, L. V.¹; Silva, M. G.^{1,2}; Giband, M.³; Barroso, P.A.V.¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Algodão, Campina Grande, Brasil. ²Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil. ³ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement – Cirad, Montpellier, França
hoff@embrapa.cnpa.br

INTRODUÇÃO

Uma das doenças que ocasionam sérios problemas econômicos a cotonicultura brasileira é a doença azul do algodoeiro. Trata-se de uma virose que é transmitida pelo pulgão *Aphis gossypii* Glover 1877 (Hemiptera: Aphididae) de maneira provavelmente persistente. Os sintomas da doença são o encurtamento dos entrenós formados após a infecção, reduzindo o porte da planta; a redução no tamanho das folhas, que ficam com as nervuras pálidas, com margens voltadas para baixo, conglomerando-se juntamente com as flores, também ocorre a diminuição do número e do tamanho dos capulhos produzidos e a depreciação da qualidade da fibra. A intensidade dos sintomas e os danos causados à planta variam com a época em que a infecção ocorreu, podendo reduzir em até 80% do porte da planta e causar sua completa esterilidade (ARAÚJO, 2001). O nível de incidência da doença a campo está relacionado com o genótipo de algodão e a quantidade de plantas hospedeiras do pulgão e, provavelmente, do vírus. O controle da doença tem sido realizado por meio de variedades resistentes e, no caso de variedades susceptíveis, pela manutenção do pulgão em níveis baixos (SANTOS, 1999). Estudos têm sido realizados através de técnicas de melhoramento genético em busca de encontrar variedades resistentes e que com isso não seja necessário o uso exacerbado de inseticidas que, além de dispendiosos, causam sérias agressões ao meio ambiente, aos animais e a saúde humana. O uso de marcadores moleculares tem constituído uma ferramenta poderosa de grande potencial para os programas de melhoramento genético. O objetivo deste trabalho foi avaliar através de marcadores microssatélites a hibridização ocorrida entre os genitores com genótipos susceptíveis e resistentes a doença azul. Uma vez comprovada a hibridização será possível selecionar a geração F1 a ser autofecundada, produzir a geração F2, avaliar a segregação e identificar marcadores ligados à resistência a doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização dos estudos foram empregados genótipos de *Gossypium barbadense* L. (MT 121 e MT 123) e cultivares de *G. hirsutum* L. (GUAZUNCHO e DELTA OPAL) selecionados como sendo estes resistentes e aqueles susceptíveis a doença azul (Ivan Schuster, comunicação pessoal). Os genitores selecionados foram plantados e, posteriormente, foram realizados os cruzamentos entre os genótipos susceptíveis e os resistentes, seguindo os procedimentos operacionais padrão adotados correntemente em casa-de-vegetação da Embrapa Algodão, submetida ao Laboratório de Biotecnologia. As folhas oriundas dos genitores e dos cruzamentos foram coletadas e levadas ao Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, onde foram extraídos o DNA seguindo o protocolo modificado de Ferreira e Grattapaglia (1998). A suspensão do DNA extraído foi quantificado em gel eletroforético de agarose 0,8% corado com Syber Green por comparação com fragmentos de tamanhos conhecidos do fago λ . Em seguida foram preparadas diluições em TE para concentração final de 10 ng/ μ l. As reações de amplificação para obtenção dos marcadores SSR foram realizadas em solução para volume final de 20 μ l contendo tampão PCR (10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl e 0,1% de Triton X-100), 0,2 mM de dNTP, 2-4 mM de MgCl₂ (dependendo do *primer*), 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo direito e reverso, uma unidade de Taq DNA polimerase e 20-25 ng de DNA dos genótipos amostrados. Os primers utilizados foram selecionados da coleção de BNL (LIU et al., 2000) e CIR (NGUYEN et al., 2004). Foram eles: BNL 3103, BNL 252, BNL 2590, CIR 246, CIR 148, CIR 203, CIR 249. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6% com 7M de uréia e corado com nitrato de prata seguindo metodologia desenvolvida por Creste et al. (2001). Os valores dos pares de



bases dos fragmentos amplificados pelos marcadores utilizados foram obtidos por comparação com *ladder* de 50 pb, utilizando a curva de regressão obtida no software *Table Curve*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os DNAs extraídos das folhas, tanto dos genitores quanto dos híbridos apresentaram quantidades e qualidades satisfatórias. Entre os pares de *primers* BNL e CIR utilizados todos foram polimórficos e a análise dos genitores mostrou genótipos contrastantes. Os alelos amplificados em pares de base (pb) caracterizaram tal contraste (Tabela 1). Como a diferença de pares de bases foi relativamente grande entre os alelos de cada genitor, foi possível identificar cada alelo na geração F1, sem que houvesse a sobreposição de bandas amplificadas.

Tabela 1. Alelos amplificados (em pb) para os genitores contrastantes de *Gossypium barbadense* (susceptível) e *G. hirsutum* (resistente).

Algodoeiro	Cultivares	Primers						
		BNL 3103	BNL 252	BNL2590	CIR 246	CIR 148	CIR 203	CIR 249
<i>G. barbadense</i>	MT 121	159	179	221	159	138	230	206
	MT 123							
<i>G. hirsutum</i>	Guazuncho	142	189	208	147	149	249	195
	Delta Opal (DO)		204					202

A avaliação molecular dos cruzamentos realizados entre os genótipos susceptíveis e resistentes a doença azul resultaram em toda a F1 apresentando os dois alelos característicos dos genitores contrastantes, o que caracterizou 100% de hibridização. As plantas híbridas apresentaram características morfológicas intermediárias entre os pais. Após a comprovação molecular e análise fenotípica dos cruzamentos foi possível selecionar dentre os cruzamentos o MT 121 X DO 4 para ser autofecundada e produzir a geração F2 para posteriormente analisar a segregação e identificar marcadores ligados a doença azul do algodoeiro.

CONCLUSÕES

A utilização de marcadores microsatélites é eficiente para comprovar a hibridização entre genitores contrastantes com genótipos susceptíveis e resistentes a doença Azul. A comprovação da hibridização é um passo importante para selecionar a geração F1 da qual será obtida a geração F2 por autofecundação.

REFERÊNCIAS

- Araújo, A. E. 2001. Cultivar, n.25, p.46-47, Pelotas.
- Creste, S.; Tulmann Neto, A.; Figueira, A. 2001. Plant Mol Biol Rep. 19. 299-306.
- Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. 1998. 3ªed. Brasília: Embrapa.
- Liu, S.; Saha, S.; Stelly, D.; Burr, B.; Cantrell, R.G. 2000. J Hered. 91. 326-332.
- Nguyen, T.B.; Giband, M.; Brottier, P.; Risterucci, A.M.; Lacape, J.M. 2004. Theor Appl Genet. 109. 167-175.
- Santos, W. J. CIA E.; Freire, E. C.; Santos, W. J. 1999. In: Cultura do Algodoeiro. (ed.) Piracicaba: POTAFOS, p. 133-179.